

УДК 634.11:575.174.015.3:577.21

РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ И ВИДОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *MALUS***Е.П. Кветко, П.В. Кузмицкая, О.А. Межнина***Научный руководитель – О.Ю. Урбанович, д.б.н., доцент,
зав. лабораторией молекулярной генетики***Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси»**

SSR-маркеры успешно применяются для различных направлений исследований: для построения генетических карт, оценки генетического разнообразия сортов, установления родословных селекционного материала [1 с. 10-14, 2 с. 1163-1165]. Для идентификации генотипов методом SSR-анализа в основном используются маркеры, ограничивающие динуклеотидные повторы. Получаемые экспериментальные данные показывают, что использование динуклеотидных повторов сопряжено с рядом недостатков. Определенную помощь в устранении недостатков может оказать создание маркеров, ограничивающих тринуклеотидные, тетрануклеотидных повторы, а также повторы с более сложной организацией повторяющегося мотива. В настоящее время использование накопленных массивов данных, полученных в результате выполнения проектов по полногеномному секвенированию геномов растений, а также секвенированию транскриптома предоставляет новые возможности для идентификации микросателлитных последовательностей и разработки новых микросателлитных маркеров, в частности ограничивающих последовательности, повторяющийся мотив в которых отличается от динуклеотидного. Такие маркеры могут обладать большей надежностью по сравнению с уже существующими, лучше подходят для практического использования [3 с. 585-587, 4 с. 835-839].

Целью данной работы было создание SSR-маркеров, повторяющийся мотив которых превышает два нуклеотида, пригодных для идентификации сортов и видов рода *Malus*. Такие маркеры позволят повысить точность методов ДНК-идентификации видов *Malus*, а также позволят определять сортовую принадлежность клоновых подвоев, в том числе у растущих деревьев, что невозможно сделать по морфологическим признакам.

В качестве объекта исследования использовали коллекцию ДНК яблони, состоящую из 28 представителей рода *Malus*, включая 22 культурных сорта яблони и 6 сортов клоновых подвоев.

Для анализа полиморфизма использовали метод ПЦР-анализа. Состав реакционной смеси для амплификации объемом 20 мкл был следующий: 10×буфер для *Taq* полимеразы с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, без MgCl_2 ; 1,5 мМ MgCl_2 ; 0,2 мМ dNTP; 0,5 нМ праймеры; 1 ЕА *Taq*-полимераза; 20 нг ДНК. Для анализа использовались праймеры производства компании «Праймтех» (Минск). Были подобраны оптимальные условия ПЦР: I-й этап: 1 цикл: 94°C - 4 мин; II-й этап: 35 циклов: 94°C – 30 сек; 50°C – 45 сек; 72°C - 1 мин; III-й этап: 1 цикл: 72°C - 7 мин. Полученные фрагменты разделяли методом капиллярного электрофореза в центре коллективного пользования «Геном» Института генетики и цитологии НАН Беларуси с помощью секвенатора ABIPRISM Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Проводили статистическую обработку данных полученного состава аллелей. Частота встречаемости аллелей рассчитывалась как отношение доли каждого аллеля к общему количеству аллелей. Величина информационного полиморфизма маркеров (PIC) вычислялась по формуле: $\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$ (где p_i – частота i -того аллеля).

Для анализа генетического разнообразия представителей сформированной коллекции рода *Malus* было разработано 24 пары SSR-маркеров, ограничивающих повторы с мотивом не менее 4 нуклеотидов, подобранные к отдельным регионам 1-10 хромосомы генома яблони сорта Golden Delicious, с использованием данных секвенирования, представленных в GenBank.

Анализа длины аллелей сортов яблони в локусах, ограниченных разработанными нами маркерами, показал, что 3 маркера не позволяли выявлять полиморфизм в исследуемых локусах микросателлитных последовательностей, 10 маркеров не позволяли получить информативных данных для оценки уровня полиморфизма, 5 маркеров показывали нечеткие фрагменты или не давали возможности оценить данные в мультиплексной ПЦР-реакции. Они были исключены из дальнейшего исследования.

В результате проведенного исследования для дальнейшей работы были отобраны 6 пар молекулярных маркеров-кандидатов: MC06L2, MC03L1, MC10L1, MC05L1, MC08L01, MC09L04. С их помощью среди 28 представителей рода *Malus* в общей сложности было выявлено 57 полиморф-

ных аллелей. Количество полиморфных аллелей для каждого маркера составило: MC06L2 – 9, MC03L1 – 6, MC10L1 – 7, MC05L1 – 9, MC08L01 – 14, MC09L04 – 12.

Расчёт частоты встречаемости аллелей показал, что аллель с наибольшей частотой встречаемости у сформированной коллекции выявляется с помощью SSR-маркера MC05L1, а аллели с наименьшей частотой встречаемости с помощью SSR-маркера MC08L01. Средняя частота встречаемости аллелей составила: MC06L2 – 11,1 %, MC03L1 – 16,7 %, MC10L1 – 14,3 %, MC05L1 – 11,1 %, MC08L01 – 7,1 %, MC09L04 – 8,3 %.

Количество уникальных генотипов, для каждого маркера составили: MC06L2 – 6, MC03L1 – 4, MC10L1 – 5, MC05L1 – 9, MC08L01 – 13, MC09L04 – 13. Среднее количество уникальных генотипов в исследованной выборке равнялось 8,3.

Р_{IC} для каждого SSR-маркера составил: MC06L2 – 0,757; MC03L1 – 0,742; MC10L1 – 0,80; MC05L1 – 0,737; MC08L01 – 0,893; MC09L04 – 0,813. Как видно из представленных результатов, величина данного показателя для маркеров MC08L01 и MC09L04 оказалась выше 0,80. В среднем для 6 маркеров Р_{IC} составил 0,79.

Примеры выявленных аллелей с помощью отобранных молекулярных маркеров-кандидатов после разделения методом капиллярного электрофореза на секвенаторе приведены на рисунке.

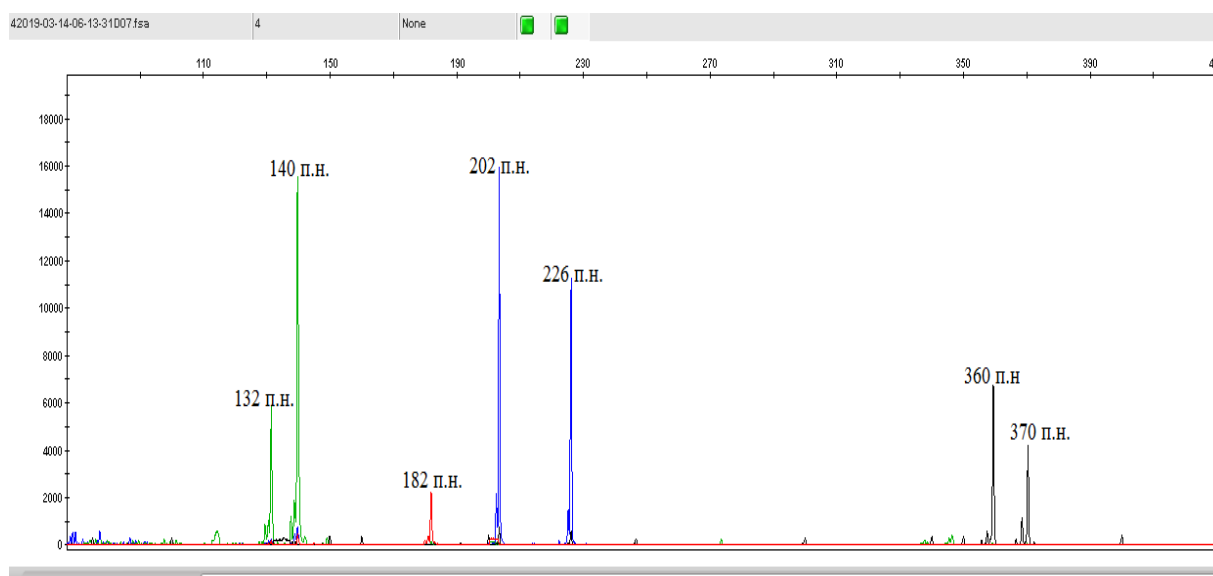


Рисунок – Аллели сорта яблони Бабушкино выявленные с помощью маркеров MC08L01 (метка R6G), MC06L2 (метка ROX), MC10L1 (метка FAM), MC09L04 (метка TAMRA) после разделения фрагментов амплификации методом капиллярного электрофореза. Длина аллелей указана цифрами в парах нуклеотидов

Подбор наиболее информативных маркеров является важной задачей при изучении генетического разнообразия любой культуры. Тестирование разработанных молекулярных маркеров на сортах яблони различного генетического происхождения позволило выделить среди них 6, характеризующихся высоким уровнем полиморфизма. Они могут являться кандидатами для включения в набор для ДНК-идентификации как сортов яблони домашней, так и сортов клоновых подвоев. Разработанные маркеры могут также быть использованы для оценки генетического разнообразия и сохранения уникальных генетических ресурсов представителей рода *Malus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ №Б18М-040.

Список использованных источников

1. Урбанович О.Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович. – Минск: Право и экономика, 2013 г. - 210 с.
2. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers / J. Urrestarazu [et al.] // Tree Genet. and Genom. – 2012. – Vol. 8. – P. 1163-1180.

3. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat / M. Prasad [et al.] // Theor Appl Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 584-592.
4. Velasco R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* (Borkh.) / R. Velasco, A. Zharkikh, J.e.a. Affourtit // Nature genetics. – 2010. – Vol. 42, № 10. – P. 833-841.